

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Oktober 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/086126 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/53**,
9/04, 1/21, C12P 7/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04143

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. April 2002 (15.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 19 274.6 20. April 2001 (20.04.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **JUELICH ENZYME PRODUCTS GMBH**
[DE/DE]; Rheingaustrasse 190-196, 65203 Wiesbaden
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GUPTA, Antje**
[DE/DE]; Im Brückfeld 20, 65207 Wiesbaden (DE).

BREESE, Klaus [DE/DE]; Staufener Strasse 29, 79115
Freiburg (DE). **BANGE, Gert** [DE/DE]; Feuerbachstrasse
1, 06108 Halle (DE). **NEUBAUER, Peter** [DE/FI]; Varik-
senpolku 10, FIN-90800 Oulu (FI).

(74) Anwälte: **ZOUNEK, Nikolai** usw.; Patentanwaltskanzlei
Zounek, Industriepark Kalle-Albert, Rheingaustrasse 190-
196, 65174 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): CZ, HU, JP, PL, SK, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/086126 A2

(54) Title: ENZYMATIC METHOD FOR THE ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF KETO COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: ENZYMATISCHES VERFAHREN ZUR ENANTIOSELEKTIVEN REDUKTION VON KETOVERBIN-
DUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to an enzymatic method for the enantioselective reduction of organic keto compounds to the
corresponding chiral hydroxy compounds, an alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus minor* and a method for the enantioselective
production of (S)-hydroxy compounds from a racemate.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von orga-
nischen Ketoverbindungen zu den entsprechenden chiralen Hydroxyverbindungen, eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus*
minor und ein Verfahren zur enantioselektiven Gewinnung von (S)-Hydroxyverbindung aus einem Razemat.

Enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von Ketoverbindungen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von organischen Ketoverbindungen zu den entsprechenden chiralen Hydroxyverbindungen, eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* und ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Gewinnung von (S)-Hydroxyverbindung aus einem Razemat.

10

Optisch aktive Hydroxyverbindungen sind wertvolle Synthesebausteine zur Herstellung einer Vielzahl pharmakologisch wichtiger Verbindungen. Diese Verbindungen sind oft schwer herstellbar durch klassische chemische Verfahren und können die für pharmakologische Anwendungen geforderte Enantiomerenreinheit
15 nur selten erreichen. Daher werden zur Herstellung chiraler Verbindungen in der Regel biotechnologische Verfahren angewendet, wobei die stereoselektive Reaktion entweder von ganzen Mikroorganismen oder mit isolierten Enzymen durchgeführt wird.

- 20 Dabei hat sich oft der Einsatz von isolierten Enzymen als vorteilhaft erwiesen, da mit solchen in der Regel höhere Ausbeuten sowie eine höhere Enantiomerenreinheit erzielbar sind.

- Dehydrogenasen und insbesondere Alkohol-Dehydrogenasen sind wertvolle
25 Katalysatoren zur Gewinnung von chiralen Produkten durch stereoselektive Reduktion von organischen Ketoverbindungen zu den entsprechenden chiralen Alkoholen. Bekannt sind im wesentlichen entsprechende Enzyme aus Hefe, Pferdeleber oder *Thermoanaerobium brockii*. Diese Enzyme benötigen als Coenzym NADH (Nicotinadenindinukleotid) oder NADPH (Nicotinadenindinukleotidphosphat). Weitere bekannte Alkohol-Dehydrogenasen sind beispielsweise eine
30

- 2 -

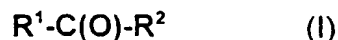
(S)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* oder eine (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase aus der Gattung *Lactobacillus*. Beide Enzymtypen haben ein breites Substratspektrum an Ketoverbindungen und weisen eine hohe Enantioselektivität auf. Die Alkohol-Dehydrogenasen aus
5 *Lactobacillus kefir* (DE 40 14 573) und *Lactobacillus brevis* (DE 196 10 984) eignen sich insbesondere zur Gewinnung von chiralen (R)-Alkoholen.

Nachteilig für die Anwendung von Alkohol-Dehydrogenasen sind allerdings die geringe Enzymstabilität und Enzymaktivität der Alkohol-Dehydrogenasen in
10 organischen Lösungsmitteln und die oft nur geringe Wasserlöslichkeit der zu reduzierenden Ketoverbindungen. Ferner ist ein weiterer limitierender Faktor für die Anwendung der Alkohol-Dehydrogenasen in organischen Lösungsmitteln der notwendige Einsatz von NADP oder NAD als Cofaktorbedarf, da der Cofaktor (NADP, NAD) wasserlöslich ist und in ökonomischen Verfahren regeneriert wird.

15 Die Erfindung bezweckt durch Modifikation der Verfahrensbedingungen die genannten Nachteile zu verbessern. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines Zwei-Phasen-Systems, enthaltend ein organisches Lösungsmittel, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und Ketoverbindung.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren weist eine hohe Standzeit auf durch die enzymstabilisierende Wirkung des Lösemittels, eine enantiomeren Reinheit von mehr als 99,9 % der hergestellten chiralen Hydroxyverbindungen und eine hohe Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge der Ketoverbindung.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft daher ein Verfahren zur enantioselektiven Reduktion einer Ketoverbindung der Formel I



- 3 -

wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
2. $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
3. $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und
5 gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4. $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und ge-
gebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
5. $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
6. $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl, oder
- 10 7. R^1 und R^2 bilden zusammen mit dem $-C(O)$ -Rest ein $-(C_6-C_{14})$ -Aryl
oder einen $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus,
wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind
oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander
durch

- 15 a) $-OH$,
- b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
- c) $-NO_2$,
- d) $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist
und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch
20 Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
- e) $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis drei-
fach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Ni-
tro,

25 dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die Verbindung der Formel I, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor
und ein organisches Lösungsmittel mit einem $\log P$ von 0,5 bis 4,0 ,

- 4 -

- b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
- c) die gebildete chirale Hydroxyverbindung isoliert.
- 5 Kohlenstoffatomen im Ring. $-(C_6-C_{14})$ -Arylreste sind beispielsweise Phenyl, Naphthyl. Unter dem Begriff Aryl werden aromatische Kohlenstoffreste verstanden mit 6 bis 14 zum Beispiel 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, Biphenyl, zum Beispiel 2-Biphenyl, 3-Biphenyl und 4-Biphenyl, Anthryl oder Fluorenyl. Biphenylreste, Naphthylreste und insbesondere Phenylreste sind bevorzugte Arylreste. Unter
- 10 dem Begriff "Halogen" wird ein Element aus der Reihe Fluor, Chlor, Brom oder Jod verstanden. Unter dem Begriff $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl wird ein Kohlenwasserstoffrest verstanden, dessen Kohlenstoffkette geradkettig oder verzweigt ist und 1 bis 20 Kohlenstoffatome enthält.
- 15 Der Begriff $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus" steht für einen monocyclischen oder bicyclischen 5-gliedrigen bis 14-gliedrigen heterocyclischen Ring, der teilweise gesättigt oder vollständig gesättigt ist. Beispiele für Heteroatome sind N, O und S. Beispiele für die Begriffe $-(C_5-C_{14})$ -Heterocyclus sind Reste, die sich von Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol, Tetrazol,
- 20 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Triazolone, Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidindione, Triazole, welche durch F, -CN, $-CF_3$ oder $-C(O)-O-(C_1-C_4)$ -Alkyl substituiert sind, 3-Hydroxypyrro-2,4-dione, 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazole, Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Indol, Isoindol, Indazol, Phthalazin, Chinolin, Isochinolin, Chinoxalin, Chinazolin, Cinnolin, -Carbolin und benz-anellierte, cyclopenta-,
- 25 cyclohexa- oder cyclohepta-anellierte Derivate dieser Heterocyclen ableiten. Insbesondere bevorzugt sind die Reste 2- oder 3-Pyrrolyl, Phenylpyrrolyl wie 4- oder 5-Phenyl-2-pyrrolyl, 2-Furyl, 2-Thienyl, 4-Imidazolyl, Methylimidazolyl, zum Beispiel 1-Methyl-2-, -4- oder -5-imidazolyl, 1,3-Thiazol-2-yl, 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 2-, 3- oder 4-Pyridyl-N-oxid, 2-Pyrazinyl, 2-, 4- oder 5-Pyrimidinyl, 2-, 3-
- 30 oder 5-Indolyl, substituiertes 2-Indolyl, zum Beispiel 1-Methyl-, 5-Methyl-, 5-

- 5 -

Methoxy-, 5-Benzyloxy-, 5-Chlor- oder 4,5-Dimethyl-2-indolyl, 1-Benzyl-2- oder -3-indolyl, 4,5,6,7-Tetrahydro-2-indolyl, Cyclohepta[b]-5-pyrrolyl, 2-, 3- oder 4-Chinolyl, 1-, 3- oder 4-Isochinolyl, 1-Oxo-1,2-dihydro-3-isochinolyl, 2-Chinoxaliny, 2-Benzofuranyl, 2-Benzo-thienyl, 2-Benzoxazolyl oder Benzothiazolyl oder Dihydropyridinyl, Pyrrolidinyl, zum Beispiel 2- oder 3-(N-Methylpyrrolidinyl), Piperazinyl, 5 Morpholinyl, Thiomorpholinyl, Tetrahydrothienyl oder Benzodioxolanyl.

Bevorzugte Verbindungen der Formel I sind 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester, Acetophenon, Acetessigsäuremethylester, Ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrat, 2,5-Hexandion Ethylpyruvat oder 2-Octanon, bevorzugt 4-Chlor-3-oxo-10 butansäureethylester. Die Verbindungen der Formel I werden im erfindungsgemäßen Verfahren in einer Menge von 2 % bis 30 % bezogen auf das Gesamtvolumen eingesetzt, bevorzugt von 10 % bis 25 %, insbesondere von 15 % bis 22 %.

15 Dem Wasser wird bevorzugt ein Puffer zugesetzt, beispielsweise Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer mit einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise ein pH-Wert von 6 bis 9. Die Pufferkonzentration beträgt von 10 mM bis 150 mM, bevorzugt von 90 mM bis 110 mM, insbesondere 100 mM. Zusätzlich enthält der Puffer auch Magnesiumionen, beispielsweise $MgCl_2$ in einer Konzentration von 20 0,2 mM bis 10 mM, bevorzugt 0,5 bis 2 mM, insbesondere 1 mM.

Die Temperatur beträgt beispielsweise von etwa 10 °C bis 70 °C, bevorzugt von 30 °C bis 60 °C.

25 Die erfindungsgemäß einsetzbaren organischen Lösungsmittel haben bevorzugt einen logP von 0,6 bis 2,0, insbesondere von 0,6 bis 1,9, insbesondere bevorzugt von 0,63 bis 1,75. Die bevorzugten organischen Lösungsmittel sind beispielsweise Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether, Dibutylether oder Essigsäureethylester, insbesondere Essigsäureethylester. Essigsäureethylester kann 30 beispielsweise in einer Menge von 1 % bis 90 % bezogen auf das Gesamtvolumen

- 6 -

des Reaktionsansatzes eingesetzt werden, vorzugsweise von 15 % bis 60 %, insbesondere von 20 % bis 50 %.

Das Verhältnis von organischem Lösungsmittel zu Wasser beträgt von 9 zu 1 bis
5 1 zu 9, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 1 zu 3.

Das Wasser bildet im erfindungsgemäßen Zwei-Phasen-System die eine flüssige Phase und das organische Lösungsmittel bildet die zweite flüssige Phase. Gegebenenfalls kann auch noch eine feste oder weitere flüssige Phase vorliegen, die
10 beispielsweise durch nicht vollständig gelöste Alkohol-Dehydrogenase oder durch die Verbindung der Formel I entsteht. Bevorzugt sind jedoch zwei flüssige Phasen ohne feste Phase. Die zwei flüssigen Phasen werden bevorzugt mechanisch gemischt, so dass große Oberflächen zwischen den beiden flüssigen Phasen erzeugt werden.

15 Die Konzentration des Cofaktors NADPH oder NADH bezogen auf die wäßrige Phase beträgt von 0,05 mM bis 0,25 mM, insbesondere von 0,06 mM bis 0,2 mM.

Bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren noch ein weiterer Stabilisator der
20 Alkohol-Dehydrogenase eingesetzt. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Glycerin, Sorbitol oder Dimethylsulfoxid (DMSO).

Die Menge an Glycerin beträgt von 5 % bis 30 % bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an Glycerin sind von 10 % bis 20 %,
25 insbesondere 20 %.

Zu Regenerierung des verbrauchten NADH oder NADPH kann im erfindungsgemäßen Verfahren zusätzlich Isopropanol zugefügt werden. Beispielsweise wird das Isopropanol und NADP mit der Alkohol-Dehydrogenase zu NADPH und
30 Aceton umgesetzt. Die eingesetzte Isopropanolmenge beträgt von 5 % bis 30 %

- 7 -

bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an Isopropanol sind von 10 % bis 20 %, insbesondere 10 %.

Geeignete Alkohol-Dehydrogenasen stammen beispielsweise aus Hefe, Pferdeleber oder *Rhodococcus erythropolis*, wobei diese Enzyme als Coenzym NADH benötigen, oder aus *Thermoanaerobium brockii*, *Lactobacillus kefir* oder *Lactobacillus brevis*, wobei diese Enzyme als Coenzym NADPH benötigen.

Wird eine Alkohol-Dehydrogenasen beispielsweise aus Hefe, Pferdeleber, *Thermoanaerobium brockii* oder *Rhodococcus erythropolis* im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, so wird aus der Verbindung der Formel I die entsprechende (S)-Hydroxyverbindung gewonnen. Wird eine Alkohol-Dehydrogenasen beispielsweise aus *Lactobacillus kefir* oder *Lactobacillus brevis* im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt, so wird aus der Verbindung der Formel I die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung gewonnen.

Die Alkohol-Dehydrogenase kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder vollständig gereinigt oder teilweise gereinigt eingesetzt werden oder in Zellen enthaltend verwendet werden. Die eingesetzten Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen.

Die Volumenaktivität der eingesetzten Alkohol-Dehydrogenase beträgt von 100 Units/ml (U/ml) bis 2000 U/ml, bevorzugt etwa 800 U/ml, bei einem Proteingehalt von etwa 20 mg/ml bis 22 mg/ml. Die bevorzugt eingesetzte Alkohol-Dehydrogenase hat eine spezifische Aktivität von etwa 35 bis 40 U/mg Protein. Je kg umzusetzender Verbindung der Formel I werden 20 000 bis 200 000 U Alkohol-Dehydrogenase eingesetzt, bevorzugt etwa 100 000 U. Der Enzymeinheit 1 U entspricht dabei der Enzymmenge die benötigt wird um 1 μ mol der Verbindung der Formel I je Minute (min) umzusetzen.

30

- 8 -

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise in einem geschlossenen Reaktionsgefäß aus Glas oder Metall durchgeführt. Dazu werden die Komponenten einzeln in das Reaktionsgefäß überführt und Rühren unter einer Atmosphäre von beispielsweise Stickstoff oder Luft gerührt. Je nach Substrat und eingesetzter Verbindung der Formel I beträgt die Reaktionszeit von 1 Tag bis 14 Tage, bevorzugt 4 bis 7 Tage.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wird die wäßrige Phase abgetrennt, die Essigsäureethylester-Phase wird gefiltert. Die wäßrige Phase kann gegebenenfalls noch einmal extrahiert werden und wie die Essigsäureethylester-Phase weiter aufgearbeitet werden. Danach wird die gefilterte Phase unter vermindertem Druck verdampft. Man erhält so beispielsweise das Produkt 4-Chlor-3-(S)-hydroxy-butansäureethylester mit einer Enantiomerenreinheit von mehr als 99,9% und im wesentlichen frei vom Edukt 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester. Die Gesamtausbeute der Prozesse beträgt nach Destillation des Produktes von 82 % bis 88% bezogen auf die eingesetzte Eduktmenge.

Überraschenderweise zeigen die organischen Lösungsmittel mit einem log-P-Wert von 0 bis 4 eine stabilisierende Wirkung auf die Alkohol-Dehydrogenase, während im Stand der Technik von der Verwendung der Zwei-Phasen-Systeme mit organischen Lösungsmittel abgeraten wird (M.R. Kula, U. Kragel; Kapitel 28, Dehydrogenases in Synthesis of Chiral Compounds; R. N. Patel, Stereoselective Biocatalyses, 2000; Peters J. 9. Dehydrogenases-Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Application, In: H.J. Rehm, G. Reed Biotechnology, Vol 3, Bioprocessing, VCH Weinheim, 1993; J. Lynda et al., Solvent selection strategies for extractive Biocatalysis, Biotechnol. Prog. 1991, 7, Seiten 116- 124). Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als organische Phase Essigsäureethylester verwendet, wobei die organische Phase zum einen als Reservoir für die Verbindung der Formel I dient, aber auch gleichzeitig das Reaktionsprodukt, die chirale Hydroxyverbindung aus der wäßrigen Phase extrahiert.

Im Gegensatz zum Stand der Technik führt der Einsatz von organischen Lösungsmitteln mit einem log-P-Wert von 0 bis 3 zu einer zusätzlichen im Zeitverlauf zunehmenden Stabilisierung der Alkohol-Dehydrogenase. Im Stand der Technik üben insbesondere organische Lösungsmittel mit einem log-P-Wert (Logarithmus des Octanol/ Wasser- Verteilungskoeffizienten) von 0 bis 2 eine besonders instabilisierende Wirkung auf Enzyme aus und kommen somit als organische Phase im Zwei-Phasen-System kaum in Betracht (K. Faber, Biotransformations in organic chemistry, 3rd edition 1997, Springer Verlag, Kapitel 3. Bis 3.17).

Die Erfindung betrifft ferner die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* mit hohem Temperaturoptimum. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 und die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 gemäß des beiliegenden Sequenzprotokolls. Diese Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* ist R-spezifisch, wobei beispielsweise aus einer Verbindung der Formel I die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung gewonnen werden kann. Die enantioselektive Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* lässt sich überraschenderweise in *Escherichia coli* RB 791 überexprimieren, während Alkohol-Dehydrogenasen aus anderen Arten der Gattung *Lactobacillus* nur in wesentlich geringerer Weise exprimiert werden konnten. Dies ist um so überraschender, da die Alkohol-Dehydrogenase im Wildstamm von *Lactobacillus minor* selbst nur sehr gering exprimiert wird und somit mit gängigen Screeningverfahren (Ganzzellbiotransformation, Aktivitätstest) nicht nachweisbar war. Es war daher sehr überraschend, dass sich aus *Lactobacillus minor* eine R-enantioselektive Alkohol-Dehydrogenase klonieren ließ und in *Escherichia coli* so außerordentlich stark überexprimierbar war (50% des Zellproteins des Klons, 20.000 Units/g Feuchtgewicht).

Das gereinigte Enzym aus *Lactobacillus minor* ist stabil in einem pH-Bereich von etwa 5,5 bis 8,5. Das Enzym ist bis etwa 40 °C stabil und das pH-Optimum der enzymatischen Reaktion liegt im Bereich von pH 7 bis pH 7,5. Das Temperaturop-

- 10 -

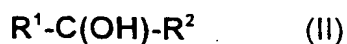
timum der enzymatischen Reaktion liegt bei etwa 55 °C. das Enzym weist ein breites Substratspektrum auf.

Das Enzym läßt sich mittels hydrophober Interaktionschromatographie bis zu einer
5 spezifischen Aktivität von 35 bis 40 U/mg Protein reinigen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Gewinnung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor*. Dazu wird die DNA, die für die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* kodiert, in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismus exprimiert. Bevorzugt wird die
10 Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* in einen *Escherichia coli* Stamm transformiert und exprimiert, insbesondere in *Escherichia coli* RB 791.

Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* läßt sich beispielsweise so
15 gewinnen, dass die rekombinanten *Escherichia coli* Zellen kultiviert werden, die Expression der Alkohol-Dehydrogenase induziert wird und anschließend nach etwa 10 bis 18 Stunden (h) die Zellen durch Ultraschallbehandlung oder durch French-Press (Gaullin, Siemens) aufgeschlossen werden. Der erhaltene Zellextrakt kann entweder direkt verwendet werden oder weiter gereinigt werden. Dazu
20 wird der Zellextrakt beispielsweise zentrifugiert und der erhaltene Überstand wird einer hydrophoben Interaktionschromatographie unterworfen. Diese Chromatographie erfolgt bevorzugt bei pH 7,0 in einem wässrigen Puffer der auch Magnesiumionen enthält.

25 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung einer enantioselektiven (S)-Hydroxyverbindung der Formel II



- 11 -

wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
2. $-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
- 5 3. $-(C_2-C_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4. $-(C_2-C_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
5. $-(C_6-C_{14})$ -Aryl,
- 10 6. $-(C_1-C_8)$ -Alkyl- $-(C_6-C_{14})$ -Aryl, oder
7. R^1 und R^2 bilden zusammen mit dem $-C(O)$ -Rest ein $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus,

wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch

- a) $-OH$,
- b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
- c) $-NO_2$,
- d) $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
- 20 e) $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

25

dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) ein racemisches Gemisch, enthaltend die Verbindung der Formel II, die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von
- 30

- 12 -

0,5 bis 4,0, beispielsweise aus der Reihe Diethylether, tertiär-Butylmethylether,

Diisopropylether oder Essigsäureethylester,

5 b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und

c) die gebildete enantiomerenreine (S)-Hydroxyverbindung isoliert.

Die Reaktionsbedingungen sind im wesentlichen dieselben wie im obengenannten
10 Verfahren zur enantiospezifischen Reduktion der Ketoverbindung der Formel I. Im
Verfahren wird jedoch statt einer enantioselektiven Reduktion der Ketoverbindung
der Formel I, die entsprechende (R)-Hydroxyverbindung der Formel II zur entsprechenden
Ketoverbindung oxydiert. Ferner wird im Verfahren anstelle von Isopropanol
Aceton zur Regenerierung von NADP eingesetzt. Beispielsweise wird das
15 Aceton und NADPH mit der erfindungsgemäßen Alkohol-Dehydrogenase zu NADP
und Isopropanol umgesetzt. Die eingesetzte Acetonmenge beträgt von 5 % bis 30
% bezogen auf das Volumen des gesamten Ansatzes. Bevorzugte Mengen an
Aceton sind von 10 % bis 20 %, insbesondere 10 %.

20 Die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase kann für die Herstellung der
Verbindung der Formel II entweder vollständig oder teilweise gereinigt vorliegen
oder kann auch enthaltend in Zellen im Verfahren eingesetzt werden. Die Zellen
können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen.

25 Gegenstand der Erfindung ist auch ein rekombinanter Klon von Escherichia coli
RB 791, der die Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus minor exprimiert und
am 26. März 2001 unter den Bedingungen des Budapester Vertrages bei der
Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg
1b, 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 14196 hinterlegt wurde.

30

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

- 5 Screening nach R-Alkohol-Dehydrogenasen in Stämmen der Gattung *Lactobacillus* mittels Ganzzellbiotransformation

Zum Screening wurden verschiedene *Lactobacillen*stämme in folgendem Medium kultiviert (Angaben jeweils g/l): Glucose (20), Hefeextrakt (5), Fleischextrakt (10),
10 Di-Ammoniumhydrogencitrat (2), Natriumacetat (5), Magnesiumsulfat (0,2), Mangansulfat (0,05), Di-Kaliumhydrogenphosphat (2).

Das Medium wurde bei 121 °C sterilisiert und die Stämme der Gattung *Lactobacillus* (im folgenden mit L. abgekürzt) wurden ohne weitere pH-Regulierung oder
15 Sauerstoffzufuhr kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und für die Ganzzellbiotransformation wurden jeweils 4g Zellen in einem Endvolumen von 10 ml Kaliumphosphatpuffer (KPi-Puffer) (50 mM, pH = 7.0) resuspendiert. Nach Zugabe von je 0,1 g Glucose wurden die Zellen für 15 min bei 30 °C geschüttelt. Zur Zellsuspension wurde 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester 4 in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben und nach jeweils 10 min und 120 min erfolgte
20 die gaschromatographische Analyse des Medium. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand filtriert und in Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 10-15 µg/ml 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester verdünnt.

- 25 Der als Substrat eingesetzte 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester wurde von den verschiedenen *Lactobacillen*stämmen mit folgender Enantiomerenreinheit zum Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat umgesetzt.

Der Enantiomerenüberschuß berechnet sich wie folgt: $ee(\%) = ((R\text{-Alkohol} - S\text{-Alkohol}) / (R\text{-Alkohol} + S\text{-Alkohol})) \times 100$.
30

Tabelle 1

Stamm Lactobacillus	ee 4-Chlor-3-(S)-hydroxy- butansäureethylester in %
L. reuteri	34,6
L. kandleri	90,0
L. collinoides	71,3
L. bif fermentans	53,6
L. oris	63,4
L. brevis	74,0
L. halotolerans	67,2
L. minor	18,6
L. parabuchneri	78,5
L. kefir	87,8
L. fructosus	28,9

Beispiel 2

Gewinnung rekombinanter R-spezifischer Alkohol-Dehydrogenasen

5 A.) Präparation genomischer DNA aus Stämmen der Gattung *Lactobacillus*

Das Zellpellet aus etwa 2 ml Kulturflüssigkeit der Gattung *Lactobacillus* wurde in 300 µl TE-Puffer (enthaltend 10 mM Tris/HCl, pH = 8, 1 mM EDTA) resuspendiert, mit 20 mg/ml Lysozym versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) (10%), 100 µl Na-Perchlorat (5M) und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde das Protein abzentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 800 µl Ethanol (EtOH) (96 %) zugegeben. Das Eppendorfgefäß wurde mehrfach invertiert und anschließend die ausgefallene chromosomale DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl EtOH gewaschen. Die DNA wurde wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt, unter verminderten Druck getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

20 B.) Oligonukleotide als 5'- und 3'-Primer für die PCR (Polymerase chain reaction)

Die für die PCR verwendeten Primer wurden von der bekannten N-terminalen und C-terminalen Sequenz der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* abgeleitet. Dabei wurden bekannte Präferenzen für bestimmte Codons in *Lactobacillen* berücksichtigt. So wurde vor jeden 5'-Primer das Codon ATG (Met) als Startcodon vorgesetzt, weiterhin wurde am 5'-Primer dem Startcodon die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bam HI (GGATCC) vorangestellt um die spätere Klonierung in den Expressionsektor zu ermöglichen. Hinter den 3'-Primer wurde das Stop codon (TAG) und die Schnittstelle

- 16 -

für Hind III (AAGCTT) gesetzt. Die Primerkonstrukte sind im folgenden aufgelistet

N = A, T, C oder G; Y = T oder C; R = A oder G

5 5'Primer

5'GCGGATCCATGACNGAYCGNTTRAARGGNAARGTNGC3' (SEQ ID NO:1)

3'Primer

5'GGGAAGCTTCTAYTGNGCNGTRTANCCNCCRTCNCAC3' (SEQ ID NO:2)

10 Die Primer wurden nach bekannten Verfahren hergestellt.

C.) PCR (Polymerase chain reaction) mit der genomischen DNA aus Stämmen der Gattung Lactobacillus

15 PCR-Ansatz (100µl):

	Einsatz pro Reaktion	Konzentration
dNTP's	8µl	je NTP 2.5 nmol/µl
Oligos	je Oligo 10µl: 20µl	2pmol/µl
chromosomale DNA	3µl	ca. 1µg/µl
10 x Puffer (Promega)	10µl	
Taq- Polymerase (Promega)	1µl	2U/µl
H ₂ O	58 µl	

dNTP's sind ein Gemisch von Desoxynucleotidtriphosphaten wie dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Zyklus:

20

95 °C 2 min, danach

- 17 -

80 °C halten

heißer Start, danach

95 °C 30 sec, danach

5

40 °C 1 min

30x

danach jeweils 30 mal 95 °C 30 sec, und 40 °C 1 min, anschließend

72 °C 2,5 min

danach

10

72 °C 2,5 min

danach

10 °C halten

15 Für die Analytik wurden 10 µl des Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR zeigte die deutliche Amplifikation eines DNA-Stückes von etwa 750 bp.

D.) Isolierung der PCR-Fragmente aus dem Gel

20

Zur Gewinnung des PCR-Fragments wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 100V elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Gel in zwei Spuren geteilt, wovon eine den kompletten PCR-Ansatz und die andere nur eine Probe von 5 µl enthielt, so dass zum Ausschneiden des PCR-Fragments aus dem Gel zur Orientierung nur die Spur mit der Probe mit Ethidiumbromid angefärbt wurde um eine Schädigung des zu isolierenden PCR-Fragment durch Ethidiumbromid und durch UV-Licht auszuschließen.

25

Die Isolierung aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von der Firma Qiagen aus Hilden.

30

- 18 -

Die Konzentrationsbestimmung ergab eine Gesamtkonzentration von 20 ng/ μ l DNA.

E.) Ligation

5

Zur Vorbereitung der Ligation wurden das gereinigte PCR-Fragment und der verwendete Klonierungsvektor pQE30 oder pQE 70 beide von der Firma Quiagen mit Bam HI und Hind III geschnitten (4 μ l DNA= 200ng DNA, 1 μ l 10xPuffer, 1 μ l Enzym, BSA und H₂O (Biolabs, New England)).

10

Das geschnittene Plasmid wurde dann erneut mittels QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt, in Wasser aufgenommen mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (USB, Amersham Life Science).

15 Zur Reinigung wurden die entsprechenden Reaktionsansätze erneut auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und so das verdaut Amplifikat sowie das Plasmid wie unter D.) beschrieben aus dem Gel isoliert. Die Konzentration von Plasmid und Amplifikat nach der Reinigung betrug etwa 20 ng/ μ l.

20 Zur Ligation wurden 3 μ l pQE30 oder pQE 70 (60ng), 2,5 μ l Amplifikat (50ng), 2 μ l Ligasepuffer (Boehringer; Mannheim), 1,5 μ l H₂O und 1 μ l T4-Ligase (Boehringer; Mannheim) eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Anschließend wurden 40 μ l elektrokompente Zellen von Escherichia coli RB791
25 mit 1,5 μ l Ligationsansatz durch Elektroporation transformiert. Die Zellen wurden in 500 μ l SOC-Medium gegeben, 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend je 250 μ l auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert. Das SOC-Medium enthält pro Liter Wasser 20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml von 1 M MgSO₄ und 10 ml von 1 M MgCl₂. LB_{amp}-Agarplatten enthalten pro Liter Wasser 10 g Trypton, 5
30 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, 20 g Agar, pH 7,0 und 50 mg Ampicillin.

- 19 -

Gewachsene Kolonien wurden abgeimpft und in 4ml Flüssigkultur (LB_{amp}-Medium) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Von dieser Zellsuspension wurden je 2 ml zur Plasmidpräparation (entsprechend dem Quiagen miniprep Protokoll (Quiagen, Hilden)) eingesetzt.

5

Von der Plasmidpräparation wurden ein Restriktionsverdau mit Bam HI und HindIII angesetzt. Der komplette Verdau wurde auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (Nachweis des 750 kp Inserts) und die Plasmide daraufhin gegebenenfalls zur Sequenzierung eingesetzt.

10 Klone mit 750 kp Insert wurden dann auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert.

F.) Sequenzierung der Plasmide

Die Sequenzierung wurde mittels dem SequiThermEXCEL II Long-Read DNA
15 Sequencing Kit (Biozym, Oldendorf) am Li-Cor-Sequenzier (MWG Biotech, Ebersberg) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Primer wurden die Standard Sequenzierungsprimer für pQE-Vektoren benutzt.

G.) Screening der Klone hinsichtlich löslicher Expression der R-ADH

20

Klone mit Inserts von 750 kp wurden hinsichtlich enzymatischer Aktivität und Stereoselektivität untersucht. Dazu wurden die Kolonien von den LB_{amp}-Agarplatten abgeimpft und in 20 ml Flüssigkulturen (LB_{amp}-Medium) bei 25 °C kultiviert. Bei einer Zelldichte (OD₅₀₀) von 0,5 erfolgte dann die Induktion mit 1mM
25 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach 18 h wurden die Zellen abzentrifugiert und je 40 mg Zellen in 350 µl Kpi-Puffer (50mM, pH = 7, 1mM MgCl₂) aufgenommen. Die Enzymfreisetzung aus den Zellen wurde durch Naßvermahlung mit Hilfe von Glasperlen (0,5 g, 0,3 mm) erreicht. Dazu erfolgte ein 20 minütlicher Aufschluß mittels Retsch-Mühle bei 4°C.

30

- 20 -

Der Enzymtest enthielt 870 μ l Triethanolaminpuffer (100mM, pH=7,0, 1mM $MgCl_2$), 100 μ l einer 100mmolaren Lösung 4-Cl-Acetessigsäureethylester, 10 μ l NADPH (Endkonzentration 0,19mM) und 20 μ l Enzymlösung.

- 5 Die Definition der Enzymeinheit: 1U entspricht der Enzymmenge die benötigt wird um 1 μ mol Substrat (4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester) pro 1 min umzusetzen.

- Zum Nachweis der Stereoselektivität wurden 480 μ l Triethanolaminpuffer (100mM; pH=7,0, 1mM $MgCl_2$) mit 1,0 mM 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester, 1,9 mM NADPH (jeweils Endkonzentration) und 20 μ l Enzymlösung inkubiert. Nach 15 min Inkubation wurde der Reaktionsansatz filtriert und 1:10 in Chloroform verdünnt und eine Probe wurde mittels GC-MS analysiert.
- 10

Bedingungen der Gaschromatographie (GC):

- 15 chirale Säule: Lipodex E, ID = 0,25mm, l = 25m (Macherey-Nagel)
1. 2 min 60°C
 2. in 28 min von 60 °C auf 130 °C mit einer Rate von 2,5 °C pro Minute
 3. 15.min bei 130 °C

20

Aus den folgenden Lactobacillenstämmen konnte eine (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase kloniert und aktiv überexprimiert werden:

Stamm	Plasmid	Klon Nummer	Aktivität in U/g Zellen*	ee in %
L. parabuchneri	pQE 30	12	450	>99,9
L. parabuchneri	pQE 30	14	170	>99,9
L. kandleri	pQE 30	11	280	>99,9
L. kandleri	pQE 70	17	710	>99,9
L. minor	pQE 30	2	2.830	>99,9
L. minor	pQE 70	3	680	>99,9
L. minor	pQE 70	4	700	>99,9

* Aktivität berechnet aus G.) (Naßvermahlung); Die Aktivitäten liegen nach Fermentation und Aufschluß mit French-Press erheblich höher.

5

H.) Enzymgewinnung und Reinigung

Der Stamm mit der höchsten enzymatischen Aktivität wurde zur Enzymgewinnung im Fermenter (Fed batch, 10 l) kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₀₀ von 40 mit 1mM IPTG. Nach 18 h erfolgte die Zellernte wobei 300 g Zellen in 3 l Kpi-Puffer (50mM, pH = 7, 1mM MgCl₂) aufgenommen wurden, anschließend erfolgte der Zellaufschluß mittels French-Press (Gaullin, Siemens). Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet und wies eine Volumenaktivität von etwa 2000 U/ml (20 000 U/g Feuchtmasse) auf.

Für die Enzymcharakterisierung wurde ein Teil des erhaltenen Enzyms mittels hydrophober Interaktionschromatographie auf Q-Sepharose ff (fast flow) gereinigt. Die verwendete Säule wurde dazu mit 50mM Kpi-Puffer pH = 7.0, 1mM MgCl₂ äquilibriert. Nach Auftragen des Rohextrakts auf die Säule und kurzem Spülen mit dem Äquilibrierungspuffer wurde das Enzym mit einem steigenden linearem

- 22 -

Salzgradienten (0-1M NaCl, 1ml/min) bei einer Salzkonzentration von etwa 0,3 M NaCl eluiert. Nach Vereinigen der enzymhaltigen Fraktionen erhielt man etwa 25 ml des gereinigten Enzyms mit einer Volumenaktivität von etwa 800 U/ml und einem Proteingehalt von 20 bis 22 mg/ml. Das so gereinigte Enzym hat also eine

5 spezifische Aktivität von etwa 35 bis 40 U/mg Protein.

Alle enzymatischen Aktivitäten wurden bei 25 °C bestimmt. Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

10 Berechnung: 1 Unit = 1µmol Substratumsatz/min
Lambert-Beersches Gesetz

Abnahme des NADPH wurde bei 340 nm verfolgt (siehe enzymatischer
Testansatz) = $\Delta E/\text{min}$

15 N = Verdünnungsfaktor Enzym
V = Volumen Enzym im ml (0,01)
 $V_{\text{küvette}}$ = Küvettenvolumen = 1 ml
d = Schichtdicke der Küvette = 1 cm
 e_{NADPH} = Extinktionskoeffizient NADPH = $6,22[\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$

20

$$\text{Aktivität} = (\Delta E/\text{min} * N * V_{\text{küvette}}) / (e_{\text{NADPH}} * V * d)$$

Proteinbestimmung wurde nach Bradford angewandt (Bio-Rad- Laboratories GmbH, Protein Assay)

25

Beispiel 3

Enzymkatalysierte Herstellung von Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat

A.) im 5 Liter Maßstab

5

Für die enzymkatalysierte Synthese von Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat aus 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester wurde der in Beispiel 2 gewonnene Rohextrakt der Alkohol-Dehydrogenase und das Coenzym NADP eingesetzt. Das oxidierte Coenzym wurde durch gleichzeitige Anwesenheit von Isopropanol kontinuierlich regeneriert, so dass die Reaktion nur katalytische Mengen an Coenzym erfordert.

10

Der Ansatz enthielt :

15

2 l Triethanolamin- Puffer 100mM pH =7.0, 1mM MgCl₂, 10% Glycerin,
400 mg NADP,
600 ml Isopropanol,
800 ml Essigsäureethylester,
600 ml 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und
etwa 100 000 Units Alkohol-Dehydrogenase.

20

Nach 3 Tagen Rühren bei Raumtemperatur konnte gaschromatographisch der vollständige Umsatz des 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester zum Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9 % Enantiomerenreinheit nachgewiesen werden.

25

Nach Abtrennung der wässrigen Phase, Abdampfen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Destillation erhält man das saubere Ethyl (S)-4 chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9%iger Enantiomerenreinheit.

B.) im 50l Maßstab

30

- 24 -

Der Reaktionsansatz zum Umsatz von 10 l 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester ist wie folgt zusammengesetzt,:

18 l Triethanolamin- Puffer 100mM pH =7.0, 1mM MgCl₂, 10% Glycerin,
4 g NADP,
5 10 l Isopropanol,
10 l Essigsäureethylester,
10 l 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und
etwa 2 Millionen Units Alkohol-Dehydrogenase (1,25l Rohextrakt).

10 Nach 7 Tagen Rühren bei Raumtemperatur konnte gaschromatographisch der vollständige Umsatz des 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylesters zum Ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrat mit über 99,9 % Enantiomerenreinheit nachgewiesen werden.

15

Beispiel 4

Biochemische Charakterisierung der klonierten Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor*

20

A.) pH-Stabilität

Die Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms bei Lagerung in Puffern mit verschiedenen pH-Werten wurde im Bereich von pH 4 bis 11 untersucht. Dazu wurden
25 verschiedene Puffer (50mM) im Bereich von pH 4 bis 11 angesetzt und das in Beispiel 2 gereinigte Enzym darin 1:100 verdünnt und 30 min inkubiert. Alle Puffer enthielten 1mM MgCl₂. Anschließend wurden davon 10µl im normalen Enzymtest eingesetzt (Triethanolaminpuffer 100mM pH = 7.0, 1mM MgCl₂, 10 mM 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und 0,19mM NADPH). Die Reaktion wurde
30 für 1min bei 30 °C und 340 nm verfolgt.

- 25 -

- Ausgangswert ist dabei der Messwert, den man unmittelbar nach Verdünnung des Enzyms in Triethanolaminpuffer 50 mM pH = 7.0 erhält. Dieser Wert entsprach unter vorgegeben Bedingungen einer Extinktionsänderung von 0,20 /min und wurde als 100%-Wert gesetzt und alle folgenden Messwerte wurden zu diesem
- 5 Wert ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 2

PH-Wert	Puffersystem	Aktivität in % (n=2)	Puffersystem	Aktivität in % (n=2)
4	Na-acetat/ Essigsäure	87,5 ± 6,5		
4,5	Na-acetat/ Essigsäure	94,5 ± 3,0		
5	Na-acetat/ Essigsäure	94,5 ± 1,5	MES/NaOH	55 ± 5
5,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	96 ± 3	MES/NaOH	77,1 ± 2,1
6	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	100 ± 0	Triethanolamin/NaOH	100 ± 0
6,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	97,5 ± 2,5	Triethanolamin/NaOH	100 ± 0
7	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	100 ± 0	Triethanolamin/NaOH	97,9 ± 2,1
7,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	97,5 ± 7,5	Tris/HCl	94,6 ± 1,3
8	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	93,0 ± 3,0	Tris/HCl	89,2 ± 0
8,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	102,5 ± 2,5	Tris/HCl	60 ± 4,2
9	Glycin/NaOH	76,5 ± 1,5	Tris/HCl	63,1 ± 4,8
9,5	Glycin/NaOH	52,5 ± 7,5		
10	Glycin/NaOH	52,5 ± 7,5		
11	Glycin/NaOH	0,0 ± 0		

10

Tabelle 2 zeigt, dass das Enzym eine gute pH-Stabilität insbesondere im sauren Bereich aufweist, dabei scheint die Enzymstabilität nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom verwendeten Puffersystem abhängig zu sein. Beispielsweise stellt

man bei der Verwendung von TRIS und MES-Puffer bei gleichem pH-Wert eine stärkere Inaktivierung des Enzyms fest als im KPi-Puffer.

Im KPi-Puffer zeigte sich im pH-Bereich von 5,5 bis 8,5 keine signifikante Inaktivierung.

5

B.) Temperaturstabilität

In analoger Weise wie unter A.) beschrieben wurde die Temperaturstabilität für den Bereich von 25 °C bis 50 °C bestimmt. Dazu wurde jeweils eine 1:100 Verdünnung des gereinigten Enzyms für 30 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und anschließend bei 30 °C mit dem obigen Testansatz gemessen. Auch hier wurde als Ausgangswert der Meßwert herangezogen, den man unmittelbar nach Verdünnung des Enzyms in Triethanolaminpuffer 50 mM pH = 7.0 erhält. Dieser Wert wurde auch hier als 100%-Wert gesetzt. Die Alkohol-Dehydrogenase aus L. minor ist bis zu einer Temperatur von 40 °C stabil. Danach sinkt die Aktivität rapide ab.

15

Tabelle 3

Temperatur	Aktivität in % (n=4)	Temperatur	Aktivität in % (n=4)
25	101 ± 3,2	40	33,4 ± 3,8
30	81,2 ± 5,8	42	0 ± 0
35	67,0 ± 1,6	45	0 ± 0
37	20,2 ± 2,4	50	0 ± 0

20

C.) pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die enzymatische Reaktion in dem jeweiligen in Tabelle 3 aufgeführten Puffer bestimmt. Die Konzentration des 4-

- 27 -

Chlor-3-oxo- butansäureethylester betrug wie im Standardtest 10 mM und von NADPH 0,19 mM. Die Reaktion wurde bei 30 °C bestimmt. Dabei konnte für das erfindungsgemäße Enzym ein pH-Optimum zwischen 7 und 7,5 ermittelt werden.

5 Tabelle 4

pH-Wert	Puffersystem	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym
4	Na-acetat/Essigsäure	85
4,5	Na-acetat/Essigsäure	132
5	MES/NaOH	218
5,5	MES/NaOH	240
6	Triethanolamin/NaOH	381
6,5	Triethanolamin/NaOH	349
7	Triethanolamin/NaOH	510
7,5	Tris/HCl	707
8	Tris/HCl	585
8,5	Tris/HCl	486
9	Tris/HCl	488
10	Glycin/NaOH	131
11	Glycin/NaOH	0

D.) Temperatur-Optimum

- 10 Zur Bestimmung der optimalen Testtemperatur wurde die Enzymaktivität von 25 °C bis 60 °C gemessen. Der Testansatz entsprach der Standardkonzentration von

- 28 -

4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester und NADPH. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich hat das Enzym seine optimale Testtemperatur bei 55 °C, anschließend sinkt die Aktivität rapide ab.

5 Tabelle 5

Temperatur	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym	Temperatur	Aktivität in U/ml unverdünntes Enzym
25	540	45	2469
30	1235	50	2469
35	1968	55	2855
40	1621	60	0

E.) Substratspektrum

10

Ferner wurden anstelle von 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester noch weitere Substrate in dem enzymatischen Testansatz eingesetzt. Dafür wurde folgender Testansatz verwendet:

15 970 µl Triethanolaminpuffer (100 mM, pH = 7.0, 1 mM MgCl₂ mit 10mM Ketoverbindung)

20 µl NADPH (0,19mM im Testansatz)

10 µl Enzym (1:100)

Dabei wurde die mit 4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester ermittelte Aktivität 100%
 20 gesetzt und die Enzymaktivitäten der anderen Substrate zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 6

Substrat	Aktivität in % (n=2)
4-Chlor-3-oxo- butansäureethylester	100
Ethylpyruvat	192,3 ± 11,5
2-Octanon	90,8 ± 1,2
Acetoacetatmethylester	120 ± 7,7
2-Oxo-4-phenylbutyratethylester	62,7 ± 4,8

5

F.) Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln

Zur Untersuchung der Enzymstabilität bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. minor* in den angegebenen Lösungsmittelgemischen 1: 100 verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert (bei nicht-wasser-
 10 mischbaren organischen Lösungsmitteln bezieht sich die Verdünnung auf die wäßrige Phase). Dabei wurde eine ständige Durchmischung beider Phasen gewährleistet (Shaker, 200rpm). Anschließend wurden 10 µl der Enzymlösung im Standardtestansatz eingesetzt. Auch hier wurde der Ausgangswert nach Verdün-
 15 nung im Puffer (Triethanolaminpuffer 100mM, pH = 7.0, 1mM MgCl₂) gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 7:

A.) wassermischbare Lösungsmittel:

Lösungsmittel	logP	t= 2h	T= 8h	t= 24h	t= 48h
Puffer		86	70	3	0
10 % Isopropanol	0,28	32	34	16	0
20 % Isopropanol	0,28	16	17	7	0
10% DMSO	-1,3	73	54	60	40
20% DMSO	-1,3	73	54	57	40
1M Sorbitol		93	74	60	6
10 % Glyzerin	-3,0	120	64	62	28
20% Glyzerin	-3,0	120	100	100	104

5

Wie aus Tabelle 7A ersichtlich wirken Glyzerin, DMSO und Sorbitol aktivierend bzw. stabilisierend auf die eingesetzte Alkoholdehydrogenase. Das im Prozess einzusetzende Isopropanol hingegen wirkt inaktivierend.

10 B.) nicht wassermischbare Lösungsmittel

Lösungsmittel	LogP	t= 2h	t= 8h	t= 24h	t= 48h
Puffer		86	70	3	0
20% Essigsäureethylester	0,68	87	50	10	8
20 % Diethylether	0,85	53	42	37	23
20 %Tert-Buthylmethylether	1,21	67	51	38	24
20 Diisopropylether	1,55	100	57	41	29
20 % Dibutylether	2,9	92	71	23	6
20 % Pentan	3,0	74	55	7	6
20 % Hexan	3,5	80	39	2	5
20 % Heptan	4	51	49	7	6
20 % Octan	4,5	87	47	2	1

Wie aus Tabelle 7B ersichtlich zeigt die untersuchte Alkoholdehydrogenase in einer breiten Zahl organischer Lösungsmittel eine beachtliche Stabilität. Auffallend ist dabei, dass Lösungsmittel mit logP- Werten zwischen 0 und 3 die untersuchte Alkoholdehydrogenase nicht stärker inhibieren als solche mit log P-Werten zwischen 3 und 4,5, insbesondere im Hinblick auf längere Inkubationszeiten (24 h und 48 h) haben Lösungsmittel mit log P-Werten zwischen 0 und 3 stabilisierende Wirkung auf die untersuchte ADH, verglichen mit den entsprechenden Werten im Puffer. Die untersuchten aliphatischen Lösungsmittel Pentan, Hexan, Heptan und Octan zeigen diese stabilisierende Wirkung bei Langzeitinkubation nicht.

10

Der log P-Wert einer Komponente X ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizient von X im Octanol/Wasser Zweiphasensystem (50/50)

$P = \text{Konzentration von X in Octanolphase} / \text{Konzentration von X in wässriger Phase}$

15

G. Enzymstabilität unter Prozessbedingungen

Zur Untersuchung der Enzymstabilität unter Prozessbedingungen wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. minor* mit den im Zwei-Phasen-System verwendeten Lösungsmittelgemischen 1 : 100 verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der Enzymlösung im Standardtestansatz eingesetzt.

20

In Tabelle 8 sind die Enzymaktivitäten in % vom Ausgangswert dargestellt.

Tabelle 8

	6 h	20 h	46 h	60 h	84 h
Triethanolamin-Puffer, 100 mM, 1 mM MgCl ₂	100	75	0	0	0
Mischung B	100	85	80	60	55
Mischung C	110	95	95	85	80
Mischung D	100	65	55	50	50

Mischung B: Puffer, 10% Glycerin, 10% Isopropanol

5. Mischung C: Puffer, 20% Glycerin, 10% Isopropanol

Mischung D: Puffer, 10% Glycerin, 10% Isopropanol + 20% Essigsäureethylester

Es wurde festgestellt, dass die rekombinate Alkohol-Dehydrogenase aus L.
10 minor in der im Zwei-Phasen-System verwendeten Kombination von Lösungsmitteln mehrere Tage stabil und aktiv ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur enantioselektiven Reduktion einer Ketoverbindung der Formel I



wobei R^1 und R^2 unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für

1. Wasserstoffatom,
- 10 2. $-(\text{C}_1\text{-C}_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
3. $-(\text{C}_2\text{-C}_{20})$ -Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
4. $-(\text{C}_2\text{-C}_{20})$ -Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
- 15 5. $-(\text{C}_6\text{-C}_{14})$ -Aryl,
6. $-(\text{C}_1\text{-C}_8)$ -Alkyl- $-(\text{C}_6\text{-C}_{14})$ -Aryl, oder
7. R^1 und R^2 bilden zusammen mit dem $-\text{C(O)-}$ Rest ein $-(\text{C}_6\text{-C}_{14})$ -Aryl oder einen $-(\text{C}_5\text{-C}_{14})$ -Heterocyclus,

20 wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch

- a) $-\text{OH}$,
- b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
- c) $-\text{NO}_2$,
- 25 d) $-\text{C(O)-O-}(\text{C}_1\text{-C}_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
- e) $-(\text{C}_5\text{-C}_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

30

- 34 -

dadurch gekennzeichnet, dass man

- 5 a) die Verbindung der Formel I, Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,5 bis 4,0,
- b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
- c) die gebildete chirale Hydroxyverbindung isoliert.
- 10
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I aus der Reihe 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester, Acetophenon, Acetessigsäuremethylester, Ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrat, 2,5-Hexandion, Ethylpyruvat oder 2-Octanon eingesetzt wird.
- 15
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,6 bis 3,0, insbesondere von 0,6 bis 1,9, eingesetzt wird.
- 20
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,63 bis 1,75 eingesetzt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether oder Essigsäureethylester eingesetzt wird.
- 25
6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Alkohol-Dehydrogenasen aus Hefe, Pferdeleber, Thermoanaerobium brockii, Rhodococcus erythropolis, Lactobacillus kefir, Lactobacillus brevis, Lactobacillus minor oder eine Alkohol-
- 30

- 35 -

Dehydrogenase mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4 eingesetzt wird.

- 5 7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puffer wie Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin-Puffer mit einem pH-Wert von 5 bis 10, bevorzugt mit einem pH-Wert von 6 bis 9, zugesetzt wird.
- 10 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass dem Puffer Magnesiumionen wie $MgCl_2$, in einer Konzentration von 0,2 mM bis 10 mM, bevorzugt 0,5 mM bis 2 mM, zugesetzt werden.
- 15 9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Cofaktor NADPH oder NADH in einer Menge von 0,05 mM bis 0,25 mM, insbesondere von 0,06 mM bis 0,2 mM, bezogen auf die wässrige Phase, zugesetzt wird.
- 20 10. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Stabilisator für die Alkohol-Dehydrogenase Glycerin, Sorbitol oder Dimethylsulfoxid zugefügt wird.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass Isopropanol zugefügt wird.
- 25 12. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der Formel I in einer Menge von 2 % bis 30 % bezogen auf das Gesamtvolumen, bevorzugt von 10 % bis 25 %, insbesondere von 15 % bis 22 %, eingesetzt wird.

- 36 -

13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur von etwa 10 °C bis 70 °C, bevorzugt von 30 °C bis 60 °C, durchgeführt wird.
- 5 14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösungsmittel in einer Menge von 1 % bis 90 % bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, vorzugsweise von 15 % bis 60 %, insbesondere von 20 % bis 50 % eingesetzt werden:
- 10 15. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von organisches Lösungsmittel zu Wasser von 9 zu 1 bis 1 zu 9, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 1 zu 3, beträgt.
- 15 16. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator in einer Menge von 5 % bis 30 % bezogen auf das Volumen des gesamten Reaktionsansatzes, bevorzugte von 10 % bis 20 %, insbesondere 20 %, eingesetzt wird.
- 20 17. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Isopropanol in einer Menge von 5 % bis 30 % bezogen auf das Volumen des gesamten Reaktionsansatzes, bevorzugte von 10 % bis 20 %, insbesondere 10 %, eingesetzt wird.
- 25 18. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Alkohol-Dehydrogenase in einer Menge von 20 000 U bis 200 000 U pro kg umzusetzender Verbindung der Formel I, bevorzugt etwa 100 000 U, eingesetzt wird.

- 37 -

19. Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4.
20. DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3.
- 5 21. Mutierte *Escherichia coli* Zelle hinterlegt unter DSM 14196.
22. Verfahren zur Gewinnung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die DNA,
10 die für die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus minor* kodiert, in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismus exprimiert, insbesondere in Zellen von *Escherichia coli* Zelle hinterlegt unter DSM 14196 exprimiert, und gegebenenfalls die Alkohol-Dehydrogenase reinigt.
- 15 23. Verfahren zur Gewinnung einer enantioselektiven (S)-Hydroxyverbindung der Formel II
- $$\text{R}^1\text{-C(OH)-R}^2 \quad (\text{II})$$
- 20 wobei R¹ und R² unabhängig voneinander gleich oder verschieden sind und für
1. Wasserstoffatom,
 2. -(C₁-C₂₀)-Alkyl, worin Alkyl geradkettig oder verzweigt ist,
 3. -(C₂-C₂₀)-Alkenyl, worin Alkenyl geradkettig oder verzweigt ist und
25 gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen enthält,
 4. -(C₂-C₂₀)-Alkynyl, worin Alkynyl geradkettig oder verzweigt ist und gegebenenfalls ein, zwei, drei oder vier Dreifachbindungen enthält,
 5. -(C₆-C₁₄)-Aryl,
 6. -(C₁-C₈)-Alkyl-(C₆-C₁₄)-Aryl, oder

- 38 -

7. R^1 und R^2 bilden zusammen mit dem $-C(O)-$ Rest ein $-(C_6-C_{14})$ -Aryl oder einen $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus, wobei die oben unter 1. bis 7. genannten Reste unsubstituiert sind oder ein- bis dreifach substituiert sind unabhängig voneinander durch

- a) $-OH$,
- b) Halogen, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod,
- c) $-NO_2$,
- d) $-C(O)-O-(C_1-C_{20})$ -Alkyl, worin Alkyl gerade oder verzweigt ist und unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro, oder
- e) $-(C_6-C_{14})$ -Heterocyclus, der unsubstituiert oder ein- bis dreifach substituiert ist durch Halogen, Hydroxyl, Amino oder Nitro,

dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) ein racemisches Gemisch, enthaltend die Verbindung der Formel II, die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase, Wasser, Cofaktor und ein organisches Lösungsmittel mit einem logP von 0,5 bis 4,0, beispielsweise aus der Reihe Diethylether, tertiär-Butylmethylether, Diisopropylether oder Essigsäureethylester,
- b) in einem Zwei-Phasen-System inkubiert und
- c) die gebildete enantiomerenreine (S)-Hydroxyverbindung isoliert.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass Aceton zugefügt wird.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Juelich Enzyme Products GmbH

<120> Enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion
von Ketoverbindungen

<130> (TH) Juelich Enzyme

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 795

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer

<400> 1

```
atgagaggat cgcattacca tcaccatcac ggatccatga ccgattcggtt gaaggggaaa 60
gttagcaattg taactggcgg taccttggga attggcttgg caatcgctga taagtattgt 120
gaagaaggcg caaaggttgt tattacgggc cgtcacgctg atgtagggtga aaaagctgco 180
agatcaatcg gcggcacaga cgttatccgt tttgtccaac acgatgcttc tgatgaaacc 240
ggctggacta agttgtttga tacgactgaa gaagcatttg gccagttac caccgttgtc 300
aacaatgccg gaattgcggt cagcaagagt gttgaagata ccacaactga agaattggcg 360
aagctgctct cagttaactt ggatcgtgtc ttcttcggta cccgtcttgg aatccaacgt 420
atgaagaata aaggactcgg agcatcaatc atcaatatgt catctatcga aggttttgtc 480
ggtgatccag ctctgggtgc atacaacgct tcaaaagggtg ctgtcagaat tatgtctaaa 540
tcagctgcct tggattcgcg tttgaaggac tacgatgttc gggttaaacac tgttcattca 600
ggttatatca agacaccatt ggttgacgat cttgaagggg cagaagaaat gatgtcacag 660
cggaoaaga caccatggg tcatatcggg gaacctaacg atatcgcttg gatctggtt 720
tacctggcat ctgacgaatc taaatttgcg actggttcag aattcgttgt cgacggaggg 780
tacaccgccc aatag 795
```

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer

<400> 2

gcggatccat gacngaycgn ttraarggna argtngc

37

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA Primer

<400> 3

gggaagcttc taytgngcng trtanscnac rtcnac

36

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> Lactobacillus sp.

<400> 4

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Met Thr Asp Arg
 1 5 10 15

Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr Leu Gly Ile Gly
 20 25 30

Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala Lys Val Val Ile
 35 40 45

Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala Arg Ser Ile Gly
 50 55 60

Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala Ser Asp Glu Thr
 65 70 75 80

Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala Phe Gly Pro Val
 85 90 95

Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Ser Lys Ser Val Glu
 100 105 110

Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser Val Asn Leu Asp
 115 120 125

Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg Met Lys Asn Lys

Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
260

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Oktober 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/086126 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53,
9/04, 1/21, C12P 7/02

Freiburg (DE). BANGE, Gert [DE/DE]; Feuerbachstrasse
1, 06108 Halle (DE). NEUBAUER, Peter [DE/FI]; Varik-
senpolku 10, FIN-90800 Oulu (FI).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04143

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. April 2002 (15.04.2002)

(74) Anwälte: ZOUNEK, Nikolai usw.; Patentanwaltskanzlei
Zounek, Industriepark Kalle-Albert, Rheingaustrasse 190-
196, 65174 Wiesbaden (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CZ, HU, JP, PL, SK, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
101 19 274.6 20. April 2001 (20.04.2001) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): JUELICH ENZYME PRODUCTS GMBH
[DE/DE]; Rheingaustrasse 190-196, 65203 Wiesbaden
(DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 6. November 2003

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): GUPTA, Antje
[DE/DE]; Im Brückfeld 20, 65207 Wiesbaden (DE).
BREESE, Klaus [DE/DE]; Staufener Strasse 29, 79115

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/086126 A3

(54) Title: ENZYMATIC METHOD FOR THE ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF KETO COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: ENZYMATISCHES VERFAHREN ZUR ENANTIOSELEKTIVEN REDUKTION VON KETOVERBIN-
DUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to an enzymatic method for the enantioselective reduction of organic keto compounds to the
corresponding chiral hydroxy compounds, an alcohol dehydrogenase from Lactobacillus minor and a method for the enantioselective
production of (S)-hydroxy compounds from a racemate.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von orga-
nischen Ketoverbindungen zu den entsprechenden chiralen Hydroxyverbindungen, eine Alkohol-Dehydrogenase aus Lactobacillus
minor und ein Verfahren zur enantioselektiven Gewinnung von (S)-Hydroxyverbindung aus einem Razemat.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/04143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/04 C12N1/21 C12P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 342 767 A (WONG CHI-HUEY ET AL) 30 August 1994 (1994-08-30)	1-18
Y	column 5 column 9 -column 13 column 19 -column 21 claims 1-6	23,24
X	EP 0 796 914 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 September 1997 (1997-09-24) cited in the application	19-22
Y	page 2 -page 4 page 16 -page 17	23,24



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2003

Date of mailing of the international search report

29/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/04143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUMMEL W: "NEW ALCOHOL DEHYDROGENASES FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL COMPOUNDS" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 58, 1997, pages 145-184, XP000677754 ISSN: 0724-6145 page 164 -page 176 ----	19-22
A	WO 96 38577 A (BIOTECHNOLOGY RES & DEV ;UNIV IOWA RES FOUND (US); DORDICK JONATHA) 5 December 1996 (1996-12-05) page 8 ----	
A	BRANDSHAW C W ET AL: "ENZYMATIC SYNTHESIS OF (R) AND (S) 1-DEUTEROHEXANOL" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, CLIFTON, NJ, US, vol. 33, no. 1, 1 April 1992 (1992-04-01), pages 15-24, XP002053169 ISSN: 0273-2289 page 15 page 22 ----	
A	BRUCE L J ET AL: "SOLVENT SELECTION STRATEGIES FOR EXTRACTIVE BIOCATALYSIS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 7, no. 2, 1991, pages 116-124, XP002237300 ISSN: 8756-7938 cited in the application the whole document ----	
A	JONSSON ASA ET AL: "Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme-catalysed reduction of ketones." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1430, no. 2, 19 March 1999 (1999-03-19), pages 313-322, XP002237301 ISSN: 0006-3002 the whole document ----	
A	HUMMEL WERNER: "Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: Recent developments." TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 17, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 487-492, XP002237302 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/04143

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5342767	A	30-08-1994	US 5225339 A	06-07-1993
EP 0796914	A	24-09-1997	DE 19610984 A1	25-09-1997
			EP 0796914 A2	24-09-1997
			JP 10028590 A	03-02-1998
			US 6225099 B1	01-05-2001
			US 6037158 A	14-03-2000
WO 9638577	A	05-12-1996	US 5719039 A	17-02-1998
			AU 704262 B2	15-04-1999
			AU 5979396 A	18-12-1996
			CA 2222733 A1	05-12-1996
			EP 0828847 A1	18-03-1998
			IL 122277 A	31-08-2000
			JP 11506333 T	08-06-1999
			WO 9638577 A1	05-12-1996
			US 6171813 B1	09-01-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/04143

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/53 C12N9/04 C12N1/21 C12P7/02		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte: Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12P C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 342 767 A (WONG CHI-HUEY ET AL) 30. August 1994 (1994-08-30)	1-18
Y	Spalte 5 Spalte 9 -Spalte 13 Spalte 19 -Spalte 21 Ansprüche 1-6	23,24
X	EP 0 796 914 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24. September 1997 (1997-09-24) in der Anmeldung erwähnt	19-22
Y	Seite 2 -Seite 4 Seite 16 -Seite 17	23,24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. April 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 29/07/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schneider, P

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/04143

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HUMMEL W: "NEW ALCOHOL DEHYDROGENASES FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL COMPOUNDS" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 58, 1997, Seiten 145-184, XP000677754 ISSN: 0724-6145 Seite 164 -Seite 176	19-22
A	WO 96 38577 A (BIOTECHNOLOGY RES & DEV ;UNIV IOWA RES FOUND (US); DORDICK JONATHA) 5. Dezember 1996 (1996-12-05) Seite 8	
A	BRANDSHAW C W ET AL: "ENZYMATIC SYNTHESIS OF (R) AND (S) 1-DEUTEROHEXANOL" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, CLIFTON, NJ, US, Bd. 33, Nr. 1, 1. April 1992 (1992-04-01), Seiten 15-24, XP002053169 ISSN: 0273-2289 Seite 15 Seite 22	
A	BRUCE L J ET AL: "SOLVENT SELECTION STRATEGIES FOR EXTRACTIVE BIOCATALYSIS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, Bd. 7, Nr. 2, 1991, Seiten 116-124, XP002237300 ISSN: 8756-7938 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
A	JONSSON ASA ET AL: "Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme-catalysed reduction of ketones." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1430, Nr. 2, 19. März 1999 (1999-03-19), Seiten 313-322, XP002237301 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument	
A	HUMMEL WERNER: "Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: Recent developments." TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 17, Nr. 12, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 487-492, XP002237302 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/04143

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5342767	A	30-08-1994	US 5225339 A	06-07-1993
EP 0796914	A	24-09-1997	DE 19610984 A1	25-09-1997
			EP 0796914 A2	24-09-1997
			JP 10028590 A	03-02-1998
			US 6225099 B1	01-05-2001
			US 6037158 A	14-03-2000
WO 9638577	A	05-12-1996	US 5719039 A	17-02-1998
			AU 704262 B2	15-04-1999
			AU 5979396 A	18-12-1996
			CA 2222733 A1	05-12-1996
			EP 0828847 A1	18-03-1998
			IL 122277 A	31-08-2000
			JP 11506333 T	08-06-1999
			WO 9638577 A1	05-12-1996
			US 6171813 B1	09-01-2001

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)